



Tepung terigu sebagai bahan makanan



Daftar isi

Daftar isi..... i

Prakata ii

1 Ruang lingkup..... 1

2 Acuan..... 1

3 Definisi 1

4 Syarat mutu 1

5 Pengambilan contoh. 3

6 Cara uji 3

7 Syarat lulus uji 19

8 Syarat penandaan 19

9 Pengemasan..... 19



Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) Tepung terigu sebagai bahan makanan ini merupakan revisi dari SNI 01-3751-1995, Tepung terigu sebagai bahan makanan. Standar ini disusun dalam rangka membantu program pemerintah dalam meningkatkan gizi masyarakat, yaitu dengan menambahkan zat besi, seng, vitamin B₁, B₂ dan asam folat. Zat besi dan seng yang selama ini dianggap sebagai kontaminan sekarang menjadi fortifikan dalam dosis tertentu.

Standar ini selain untuk melindungi konsumen juga melindungi produsen, serta mendukung perkembangan industri hasil pertanian.

Standar ini telah dibahas melalui rapat-rapat teknis, prakonsensus di Balai Besar Industri Hasil pertanian (BBIHP) Bogor, dan terakhir dibahas dalam rapat konsensus nasional di Jakarta pada tanggal 2 Pebruari 2000. Hadir dalam rapat tersebut wakil-wakil dari produsen, konsumen, lembaga ilmu pengetahuan, ahli gizi, perwakilan UNICEF Jakarta, Pustan, Direktorat Industri Agro dan instansi terkait lainnya.

Standar Nasional Indonesia (SNI) Tepung terigu sebagai bahan makanan disusun oleh Balai Besar Industri Hasil Pertanian (BBIHP), Departemen Perindustrian dan Perdagangan, Bogor.

Standar ini mengacu:

Codex Alimentarius Commision 1994, Codex Stan 152-1985 (amended 1991), *Codex standards for wheat flour* in codex alimentarius volume VII: *Codex standards for cereals, pilses, legumes and derived products. Food and agricultural organization of the United Nations. World Health Organization*, second edition, Rome.

AOAC-1990, *Offical methods of analysis of the association of official analytical chemist*, vol I 15th ed., AOAC Arlington, Virginia.

AACC method 56-81 B, (*Physico chemical test*) *Falling number determination*.

SK Menkes RI No. 632/Menkes/SK/VI/1998 tentang *Fortifikasi tepung terigu*.

Tepung terigu sebagai bahan makanan

1 Ruang lingkup

Standar ini meliputi ruang lingkup, acuan, definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, cara uji, syarat lulus uji, syarat penandaan dan pengemasan untuk tepung terigu sebagai bahan makanan.

2 Acuan

SNI 01-3751-1995, Tepung terigu sebagai bahan makanan.

3 Definisi

3.1 Tepung terigu sebagai bahan makanan adalah tepung yang dibuat dari endosperma biji gandum *Triticum aestivum* L. (*Club wheat*) dan / atau *Triticum compactum* Host.

3.2 Standar ini tidak berlaku untuk:

- a) tepung terigu yang dibuat dari gandum jenis *Durum* (*Triticum durum* Desf);
- b) produk gandum keseluruhan (*Whole meal*) dan semolina (*farina*);
- c) tepung terigu yang ditujukan untuk penggunaan bir (*Brewing adjunct*) atau untuk pembuatan pati dan / atau gluten;
- d) tepung terigu untuk keperluan non makanan;
- e) tepung yang telah mengalami perlakuan khusus, selain perlakuan pengeringan, pemucatan.

4 Syarat mutu

Syarat mutu tepung terigu sebagai bahan makanan sesuai tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1 Spesifikasi persyaratan mutu

No.	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bentuk	-	serbuk
1.2	Bau	-	normal (bebas dari bau asing)
1.3	Rasa	-	normal (bebas dari bau asing)
1.4	Warna	-	putih, khas terigu
2	Benda asing	-	tidak boleh ada
3	Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongannya yang tampak ¹⁾		tidak boleh ada

No.	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
4	Kehalusan, lolos ayakan 212 milimikron	-	min. 95%
5	Air	%, b/b	maks. 14,5%
6	Abu	%, b/b	maks. 0,6 %
7	Protein (N x5,7)	%, b/b	min. 7,0 %
8	Keasaman	mg KOH/100 g	Maks. 50/100 g contoh
9	<i>Falling number</i>	detik	min. 300
10	Besi (Fe)	mg/kg	min. 50
11	Seng (Zn)	mg/kg	min. 30
12	Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	min 2,5
13	Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	min. 4
14	Asam folat	m/kg	min.2
15	Cemaran logam		
15.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 1,10
15.2	Raksa (Hg)	mg/kg	maks.0,05
15.3	Tembaga (Cu)	mg/kg	maks. 10
16	Cemaran arsen	mg/kg	maks. 0,5
17	Cemaran mikroba		
17.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 10 ⁶
17.2	<i>E. coli</i>	APM/g	maks. 10
17.3	Kapang	koloni/g	maks. 10 ⁴

¹⁾ Tepung terigu di tingkat produsen.

5 Pengambilan contoh.

Pengambilan contoh sesuai dengan SNI 19-0428-1998, Petunjuk pengambilan contoh padatan.

6 Cara uji

6.1 Keadaan

Cara uji keadaan sesuai dengan SNI 01-2891-1992, Cara uji makanan dan minuman, butir 1.2.

6.2 Benda asing

Cara uji benda asing sesuai dengan SNI 01-2891-1992, Cara uji makanan dan minuman, butir 1.3.

6.3 Serangga dalam semua bentuk stadia dan potongan-potongan yang nampak (ulat, kepompong, serangga atau potongan serangga)

6.3.1 Prinsip

Mengamati contoh secara visual (menggunakan kaca pembesar).

6.3.2 Peralatan

- a) lempeng kaca;
- b) ayakan;
- c) kaca pembesar.

6.3.3 Cara kerja

- a) timbang kira-kira 25 gram contoh dan letakkan sambil ditekan di antara dua lempeng kaca sampai tebalnya sekitar 0,25 cm - 0,50 cm biarkan selama 24 jam;
- b) amati dengan menggunakan kaca pembesar, apakah ada jejak-jejak bekas pergerakan ulat pada permukaan kaca (atas dan bawah).

6.4 Kehalusan

6.4.1 Prinsip

Pengukuran derajat kehalusan dari contoh.

6.4.2 Peralatan

- a) alat penggoyang saringan;
- b) seperangkat saringan dan piring/penampung Ø 8 inchi, 212 milimikron;
- c) neraca analitik, terkalibrasi.

6.4.3 Cara kerja

- a) timbang ($50 \pm 0,1$) g contoh, masukkan ke dalam saringan yang dipasang pada alat penggoyang, dan goyangkan selama 5 menit;
- b) timbang bagian yang tertinggal dalam saringan.

6.4.4 Perhitungan

$$\text{Kehalusan} = \frac{\{ 100 - (\frac{W_1}{W} \times 100) \}}{W}$$

dengan:

W_1 adalah berat bagian yang tertinggal dalam saringan, dinyatakan dalam g;

W adalah berat contoh, dinyatakan dalam g.

6.5 Air

6.5.1 Prinsip

Kehilangan berat pada pemanasan 130°C selama 1 jam yang dianggap sebagai kadar air.

6.5.2 Peralatan.

- a) eksikator;
- b) pinggan alumunium dengan penutup;
- c) oven terkalibrasi;
- d) neraca analitik, terkalibrasi.

6.5.3 Cara kerja

- a) timbang 2 g contoh ke dalam pinggan dingin yang sebelumnya sudah dipanaskan pada suhu $(130 \pm 3)^\circ\text{C}$;
- b) buka tutup pinggan dan panaskan dalam oven $(130 \pm 3)^\circ\text{C}$ selama satu jam (satu jam setelah suhu oven 130°C);
- c) tutup pinggan ketika masih di dalam oven, kemudian pindahkan ke dalam eksikator,

- dinginkan;
d) timbang setelah mencapai suhu ruang.

6.5.4 Perhitungan

$$\% \text{ air} = \frac{W_1}{W} \times 100 \%$$

dengan:

W_1 adalah kehilangan berat (berat yang menguap), dinyatakan dalam g;

W adalah berat contoh, dinyatakan dalam g.

6.6 Abu

6.6.1 Prinsip

Zat-zat organik diuraikan menjadi air dan CO_2 , sedangkan zat-zat anorganik yang tertinggal dihitung sebagai abu.

6.6.2 Peralatan

- a) eksikator yang berisi desikan;
b) cawan porselin, kuarsa atau platina;
c) tanur listrik, terkalibrasi;
d) neraca analitik terkalibrasi.

6.6.3 Cara kerja

- a) timbang 3 g — 5 g contoh dalam cawan yang sudah dipijarkan;
b) arangkan di atas api dengan nyala kecil, kemudian abukan di dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
c) dinginkan dalam eksikator hingga suhu kamar dan timbang;
d) masukkan lagi ke dalam tanur, dinginkan dalam eksikator dan timbang hingga bobot tetap.

6.6.4 Perhitungan

$$\% \text{ abu} = \frac{W_1}{W} \times 100\%$$

dengan:

W_1 adalah bobot abu, dinyatakan dalam g;

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g.

6.7 Protein ($N \times 5,7$)

Cara uji protein sesuai dengan SNI. 01-2891-1992, Cara uji makanan dan minuman, butir 7.1.

6.8 Keasaman

6.8.1 Prinsip

Lemak dari hasil ekstraksi contoh dilarutkan pelarut organik yang dilanjutkan dengan peniteran menggunakan KOH.

6.8.2 Peralatan

- a) buret 10 ml, terkalibrasi;
- b) Erlenmeyer asah 250 ml;
- c) seperangkat alat ekstraksi lemak;
- d) penangas air;
- e) neraca analitik, terkalibrasi.

6.8.3 Pereaksi

- a) larutan toluena-alkohol fenolftalein (PP) 0,02 %;
Tambahkan satu liter alkohol dan 0,4 g PP ke dalam satu liter toluena.
- b) larutan alkohol PP 0,04%;
Tambahkan 0,4 g PP ke dalam satu liter alkohol.
- c) larutan baku KOH 0,0178 N (bebas karbonat).

Refluks satu liter etanol dengan 8 gram KOH dan 5 gram lempeng aluminium selama satu jam kemudian sulingkan. Larutkan 7 gram KOH dengan sulingan di atas, biarkan beberapa hari kemudian saring. Encerkan 5 kali dengan air suling bebas CO_2 untuk memperoleh larutan KOH 0,0178 N.

1 ml = 1 mg KOH.

6.8.4 Cara kerja

- a) ekstrak ($10 \pm 0,01$) g contoh dengan petroleum eter selama 4 jam - 6 jam di atas alat ekstraksi lemak;
- b) uapkan di atas penangas air;

- c) larutkan residu dengan 50 ml toluena-alkohol PP;
- d) titer dengan KOH sampai warna merah jambu atau dari larutan kuning menjadi sindur merah jambu. Jika terjadi emulsi selama peniteran, tambahkan lagi 50 ml larutan toluena – alkohol PP. Titik akhir harus sebanding dengan warna larutan yang dibuat dari penambahan 2,5 ml larutan KMnO_4 0,01 % pada 50 ml larutan $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (tambahkan beberapa tetes $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,5 % pada 50 ml air, kemudian tambahkan 2,5 ml larutan KMnO_4 0,01 %);
- e) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi yang sama dengan untuk contoh.

6.8.5 Perhitungan

Keasaman lemak dihitung sebagai mg KOH yang diperlukan untuk menetralkan asam lemak babas dari 100 g contoh.

$$\text{Keasaman lemak} = (V - V_1) \times 10$$

dengan:

V adalah volume KOH yang diperlukan dalam peniteran, dinyatakan dalam ml;

V_1 adalah blanko, dinyatakan dalam ml.

6.9 Falling number

6.9.1 Prinsip

Mengukur aktivitas enzim α - amilase dalam contoh.

6.9.2 Peralatan

- a) sebagai *falling number* – *perten* (*Unique identification*: 1800 / 93114);
- b) neraca analitik terkalibrasi;
- c) pipet volume;
- d) penggiling sampel, yang mampu menghasilkan butiran dengan ukuran partikel sebagai berikut:

- lebih besar dari 500 μm	0 % – 10 %
- lebih besar dari 210 μm lebih kecil dari 500 μm	25 % – 40 %
- lebih kecil dari 210 μm	50 % -75 %

Sebagai contoh:

falling number 3100 grinder dengan ukuran saringan 0,8 (*Unique identification*: 3100 / 116243).

6.9.3 Pereaksi

Air suling (aquades)

6.9.4 Cara kerja

- a) nyalakan alat *falling number* sampai air dalam penangas air mendidih dan selama analisis air dalam penangas air harus selalu mendidih. Volume air dan sistem pendingin harus dicek secara teratur, paling sedikit setiap hari. Tempatkan *black cassette* padaudukan dengan bagian melingkar menghadap keluar. Letakkan tabung viskometer yang kering dan bersih pada setiap lubang dalam cassette. Jika identifikasi sampel akan dicetak tekan *LEFT ID* nomor kode sampel – *ENTER*, *RIGHT ID* nomor kode sampel – *ENTER*;
- b) tambahkan 25 ml aquades dalam kedua tabung viskometer. Timbang dua sampel (duplo) masing-masing $7,00\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ (dihitung berdasarkan 14 % m.b) kemudian masukkan dalam tabung viskometer;
- c) tutup tabung viskometer dengan *stopper* dan kocok 30 kali untuk memperoleh suspensi yang homogen. Buka *stopper*, skrap sisa suspensi yang masih menempel pada *stopper*. Kemudian dengan menggunakan viskometer *stirrer* yang bersih dan yang kering tekan ke bawah sambil membersihkan sampel yang masih menempel di dinding tabung;
- d) masukkan tabung viskometer dan *stirrer* ke dalam penangas air (dilakukan selama 30 detik - 60 detik setelah dikocok). Sisi *black cassette* yang melingkar menghadap keluar;
- e) tekan segera tombol *START* (berwarna hijau) setelah tabung ditempatkan dalam penangas air;
- f) ketika tombol *START* ditekan, *startarm* bergerak ke depan dan *counter* menunjukkan angka (detik);
- g) apabila *counter* menunjukkan angka 5 tepat, *stirring* dimulai dengan kecepatan 2 *stroker* per detik;
- h) pada detik ke-60, *stirring* berhenti dan *stirrer* viskometer dilepas. *Stirrer* akan turun melalui suspensi gelatin, analisis selesai ditunjukkan dengan bunyi alarm;
- i) baca nilai *falling number* pada *counter* sebagai total waktu (detik);
- j) kisaran hasil 2 x ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil *falling number* atau

maksimal 2,5 % dari deviasi. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2,5 % analisis harus diulang kembali.

6.9.5 Perhitungan

Nilai *Falling Number (FN)* tidak boleh untuk perhitungan komposisi campuran tepung secara langsung. FN mempunyai hubungan kurva linier dengan aktivitas enzim α - amylase.

Hubungan ini diekspresikan sebagai garis lurus dengan mengkonversikannya FN ke rumus PLN (*Patten Liquefaction Number*).

$$\text{Patten Liquefaction Number} = \frac{6000}{\text{FN} - 50}$$

6.10 Besi

6.10.1 Metode spektrofotometer. serapan atom (*Atomic Absorption Spectrophotometry* = AAS)

6.10.1.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan asam menjadi larutan Fe. Larutan Fe ditetapkan dengan metode AAS pada panjang gelombang 248,3 nm.

6.10.1.2 Pereaksi

- HCl 5 N atau HNO₃ 1 N;
Encerkan 415 ml HCl 37 % BJ 1,19 atau 350 ml HNO₃ 65 % BJ 1,4 ke dalam labu ukur satu liter.
- larutan baku Fe 1000 mg/liter;
Larutkan larutan baku Fe tersebut ke dalam labu ukur satu liter dengan HCl 5 N / HNO₃ 1 N, himpitkan dan kocok. Simpan dalam botol plastik.
- larutan baku Fe mg/l;
Pipet 5 ml larutan baku Fe (b) ke dalam labu ukur 100 ml, himpitkan dan kocok.
- larutan deret baku Fe.
Tuangkan larutan baku Fe (c) ke dalam labu ukur 100 ml, masing-masing 0,4 ml; 1,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; 6,0 ml dan 8,0 ml; tambahkan 10 ml HCl 5 N / HNO₃ 1 N ke dalam masing-masing labu tersebut, himpitkan dan kocok.

6.10.1.3 Peralatan

- pipet volume 1 ml, 2 ml, 5 ml, dan 10 ml;

- b) labu ukur 50 ml dan 100 ml;
- c) cawan kuarsa/porselin/platina;
- d) tanur listrik;
- e) neraca analitik;
- f) AAS beserta perlengkapannya.

6.10.1.4 Cara kerja

- a) timbang contoh sebanyak 5 g – 10 g dalam cawan;
- b) arangkan di atas penangas listrik atau nyala kecil, kemudian abukan dalam tanur listrik pada suhu $(550 \pm 10) ^\circ\text{C}$ sampai putih dan kelabu;
- c) larutkan abu dengan 10 ml HCl 5 N atau HNO_3 1 N (panaskan di atas penangas listrik hingga abu larut sempurna) masukkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas cawan hingga bersih, kemudian himpitkan dan kocok;
- d) buat larutan blanko dengan penambahan pereaksi seperti contoh;
- e) tetapkan absorbensi larutan-larutan standar, contoh dan blanko dengan alat AAS sesuai instruksi kerja alat pada panjang gelombang 248,3 nm;
- f) hitung kandungan besi dalam contoh.

6.10.1.5 Perhitungan

$$\text{mg/kg Fe} = \frac{f \times b}{m}$$

dengan:

f adalah faktor pengenceran;

b adalah mg/kg dari kurva baku;

m adalah berat contoh, dinyatakan dalam g.

6.10.2 Metode spektrofotometri

6.10.2.1 Cara pengabuan kering

6.10.2.1.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan Fe yang terlarut direaksikan membentuk ion kompleks yang berwarna oranye merah. Warna yang timbul dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 510 nm.

6.10.2.1.2 Peralatan

- a) pipet 10 ml;
- b) Labu ukur 100 ml dan 25 ml;
- c) cawan platina atau porselin Ø 60 mm, volume 35 ml;
- d) tanur;
- e) penangas listrik;
- f) neraca analitik terkalibrasi;
- g) spektrofotometer.

6.10.2.1.3 Pereaksi

- a) HCl p.a;
- b) larutan hidroksilamin hidroklorida; -
Larutkan 10 g $\text{H}_2\text{NOH} \cdot \text{HCl}$ dalam air dan encerkan hingga 100 ml.
- c) larutan dapar asetat;
Larutkan 83 g NaOAc anhidrat (yang sebelumnya dikeringkan pada 100 °C) dalam air, tambahkan 12 ml HOAc dan encerkan hingga 100 ml (mungkin perlu untuk menyuling kembali HOAc dan encerkan hingga 100 ml (mungkin perlu untuk menyuling kembali HOAc dan mengkristalkan lagi NaOAc dari H_2O tergantung pada jumlah Fe yang ada).
- d) larutan orto- fenantrolina;
Larutkan 0,1 g orto-fenantrolina dalam 80 ml air pada suhu 80 °C, dinginkan dan encerkan hingga 100 ml.

CATATAN

Pereaksi ini disimpan di tempat dingin dan gelap agar stabil selama beberapa minggu.

- e) larutan α - α dipiridil;
Larutkan 0,1 g α - α - dipiridil dengan air dan encerkan hingga 100 ml.

CATATAN

Pereaksi ini disimpan di tempat dingin dan gelap agar stabil selama beberapa minggu.

- f) larutan baku besi (Fe) 0,01 mg / ml (10 ppm).

Larutkan 0,1 g kawat Fe p.a dalam 20 ml HCl dan 50 ml air dan encerkan hingga satu liter. Encerkan 100 ml larutan tersebut hingga satu liter atau larutkan 3,512 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dalam air, tambahkan 2 tetes HCl dan encerkan hingga 500 ml. Encerkan 10 ml larutan ini hingga satu liter.

6.10.2.1.4 Cara kerja

- abukan 10 g contoh dalam cawan hingga putih (bebas karbon);
- dinginkan, tambahkan 5 ml HCl, biarkan asam membilas bagian atas cawan dan uapkan hingga hampir kering di atas penangas air;
- larutkan residu di atas dengan menambah 2,0 ml HCl dengan tepat, dan panaskan 5 menit di atas penangas air dengan tutup arloji. Bilas kaca arloji dengan air, saring ke dalam 100 ml labu ukur, dinginkan himpitkan;
- pipet 10 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 25 ml. Tambahkan satu ml $\text{H}_2\text{NOH.HCl}$. Setelah beberapa menit kemudian, tambahkan 5 ml larutan dapar dan satu ml ortofenantrolina atau 2 ml larutan α - α dipiridil, kemudian himpitkan;
- tetapkan serapannya dengan spektrofotometer atau fotometer pada panjang gelombang 510 nm;
- tentukan konsentrasi Fe (dari pembacaan) dengan pembandingan larutan deret baku Fe;
- lakukan blanko sebagai koreksi;
- hitung Fe dalam contoh sebagai mg/kg.

6.10.2.1.5 Persiapan deret larutan baku

- siapkan lima (5) larutan yang mengandung 10,0 ml; 20,0 ml; 30,0 ml; 40,0 ml; dan 50,0 ml larutan standar Fe dalam labu ukur 100 ml;
- tambahkan 2,0 ml HCl dan himpitkan;
- pipet masing-masing 10 ml dari larutan di atas dan lanjutkan seperti untuk contoh (dari 6.10.2.1.4. d) dan seterusnya.

6.10.2.1.6 Perhitungan

$$\text{mg /kg} = \frac{\mu\text{g Fe/ ml dari kurva} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{g contoh}}$$

6.11 Seng (Zn)

Cara uji sesuai dengan SNI 19-2896-1998 I Rev. 1992, Cara uji cemaran logam dalam makanan, butir 5.

6.12 Vitamin B₁ (thiamin) dan vitamin B₂ (riboflavin)**6.12.1 Prinsip**

Ekstraksi vitamin dengan menggunakan asam klorida pada pH 4,5 yang kemudian dilakukan pemisahan melalui kolom jenis C₁₈ dengan fase gerak metanol – air yang mengandung

natrium heksan sulfonat dan diperiksa pada panjang gelombang 254 nm.

6.12.2 Peralatan

- a) HPLC yang ditengkapi dengan integrator;
 Detektor : UV, panjang gelombang 254 nm
 Kolom : Mikrobondapak C₁₈ panjang 30 cm, diameter 3,9 mm
 Kecepatan alir : 1,0 ml / menit
 Penyaring : Whatman No. 42 dan Millipore HV 0,45 µm
 Volume injek : 20 µl
- b) neraca analitik;
- c) penangas air;
- d) Labu ukur,
- e) labu Erlenmeyer;
- f) pipet ukur;
- g) pipet volume;
- h) tabung kimia;
- i) spatula.

6.12.3 Pereaksi

- a) larutan HCl 0,1 N
 - masukkan air suling ± 250 ml ke dalam labu ukur 1000 ml;
 - pipet 8,33 ml HCl pekat, masukkan dalam labu ukur;
 - encerkan hingga tanda tera dengan air suling;
 - kocok sampai homogen.
- b) larutan natrium asetat 2 M
 - timbang 42,015 gram Na asetat;
 - masukkan dalam Tabu ukur 250 ml;
 - tambahkan 50 ml aquadest, kocok sampai larut;
 - encerkan hingga tanda tera dengan air suling; kocok hingga homogen.
- c) standar vitamin B₁
- d) standar vitamin B₂

6.12.4 Penyiapan larutan standar vitamin B₁ dan B₂ 100 µg/ml

- a) timbang masing-masing standar dengan teliti 0,0100 gram;
- b) masukkan pada labu Erlenmeyer 100 ml;
- c) tambahkan 50 ml HCl 0,1 N, kemudian kocok;
- d) panaskan pada suhu 95 °C -100 °C pada penangas air selama 30 menit;
- e) dinginkan pada suhu kamar;

- f) atur pH larutan campuran standar hingga mencapai 4,5 dengan penambahan larutan natrium asetat 2 M dengan menggunakan alat pH-meter atau kertas penunjuk pH;
- g) masukkan larutan campuran standar pada labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan sampai tanda tera dengan air suling;
- h) kocok sampai homogen;
- i) saring dengan kertas saring Whatman No. 42;
- j) hasil saringan disaring kembali dengan penyaring cartridge C₁₈;
- k) larutan siap untuk diinjeksikan pada HPLC.

6.12.5 Penyiapan larutan contoh

- a) timbang 5 g – 7 g contoh dengan teliti yang sebelumnya telah dihaluskan;
- b) masukkan dalam labu Erlenmeyer 100 ml;
- c) tambahkan 50 ml HCl 0,1 N, kemudian kocok;
- d) panaskan pada penangas air dengan suhu 95 °C – 100 °C selama 30 menit;
- e) dinginkan pada suhu kamar;
- f) atur pH larutan contoh hingga mencapai 4,5 dengan penambahan larutan natrium asetat 2 M dengan menggunakan alat pH-meter atau kertas penunjuk pH;
- g) masukkan larutan contoh pada labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan sampai tanda tera dengan air suling;
- h) kocok sampai homogen;
- i) saring dengan kertas saring Whatman no. 42;
- j) hasil saringan disaring kembali dengan penyaring cartridge C₁₈;
- k) larutan siap untuk diinjeksikan pada HPLC;
- l) kerjakan juga blanko dengan pengerjaan seperti di atas.

6.12.6 Penyiapan larutan fase gerak

- a) siapkan campuran metanol : asam asetat : air (32 : 1 : 67) tambahkan larutan 5 M Na heptansulfonat;
- b) kocok sampai homogen;
- c) larutan disaring dalam penyaring Millipore 0,45 µm;
- d) larutan fase gerak siap dipakai untuk HPLC.

6.12.7 Analisis contoh dengan HPLC

- a) siapkan alat HPLC dengan kondisi seperti di atas;
- b) periksa *base line* dengan menyuntikkan blanko;
- c) suntikkan larutan standar;
- d) suntikkan larutan contoh.

6.12.8 Perhitungan

$$C_{sp} = \frac{\frac{A_{sp}}{A_{st}} \times C_{st}}{W_{sp}}$$

dengan:

C_{sp} adalah konsentrasi contoh, dinyatakan dalam $\mu\text{g/l}$;

A_{sp} adalah area contoh;

A_{st} adalah area standar;

C_{st} adalah konsentrasi standar, dinyatakan dalam $\mu\text{g/ml}$

W_{sp} adalah bobot contoh, dinyatakan dalam g.

6.13 Asam folat

6.13.1 Prinsip

Penetapan asam folat dengan membandingkan asam folat dari contoh terhadap asam folat standar dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm.

6.13.2 Peralatan

- a) neraca analitik;
- b) otoklaf;
- c) inkubator;
- d) lemari pendingin;
- e) spektrofotometer.
- f) buret;
- g) Erlenmeyer 100 ml, 250 ml dan 1000 ml yang terbuat dari kaca berwarna kecoklatan (*amber glass*);
- h) labu ukur 100 ml, 250 ml dan 500 ml yang terbuat dari kaca berwarna kecoklatan (*amber glass*);
- i) penutup asah terbuat dari kaca berwarna kecoklatan (*amber glass*);
- j) tabung reaksi (180 x 18 ml);
- k) penutup *cap-o-test*;
- l) kertas saring NR 602 $1/2$;
- m) pipet ukur;
- n) sengkelit (jarum ose);
- o) kuvet;
- p) sendok;
- q) penangas air es.

6.13.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) *bacto Lactobacili* MRS –Agar (MRS-Agar);
- b) kultur *Lactobacillus casei*;
- c) mikro *inokulum broth*;
- d) larutan saline;
- e) *bacto - agar*,
- f) susu bubuk skim;
- g) *bacto folic acid casei medium*
- h) asam folat standar;
- i) larutan penyangga pH 6,1;
- j) NaOH 0,1 N;
- k) CaCl₂ 2%;
- l) alkohol.

6.13.4 Cara kerja

6.13.4.1 Pengembangbiakan *Lactobacillus casei*

- a) timbang 55 g MRS-Agar + 15 g *bacto – agar*,
- b) tambahkan 1,5 % susu bubuk skim;
- c) buat menjadi 11 sesuai aturan yang tertera di label MRS- Agar;
- d) bagikan sebanyak 6 ml di setiap tabung reaksi;
- e) kemudian disteril sesuai peraturan yang tertera di label MRS-Agar;
- f) dinginkan;
- g) inokulasikan sengkeli benih *Lactobacillus* di tabung reaksi tersebut (persiapkan jumlah tabung reaksi sesuai keperluan tes);
- h) satu hari sebelum diperlukan, inokulasikan sengkeli biakan (g) tersebut di atas ke dalam mikro *inokulum broth* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam;
- i) enam jam sebelum lakukan tes inokulasi 2 tetes (\pm 0,1 ml) biakan (h) tersebut di atas ke dalam 10 ml mikro *inokulum broth*, kemudian diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 6 jam (medium A)

6.13.4.2 Persiapan contoh

- a) timbang 1 g – 3 g contoh homogen (jumlah timbangan secukupnya sehingga contoh mengandung kira-kira 1 µg asam folat) ke dalam Erlenmeyer 250 ml;
- b) larutkan dengan 30 ml larutan penyangga pH 6,1;

- c) kemudian diotoklaf pada suhu 102 °C selama 20 menit;
- d) pindahkan ke dalam labu ukur 100 ml dan tambahkan 0,8 ml CaCl₂ 2%;
- e) diencerkan sampai tanda dengan air suling;
- f) kemudian disaring dengan kertas saring NR 602 1/2;
- g) encerkan hasil saringan sampai akhir pengenceran mengandung kira-kira 0,2 µg/ml asam folat (larutan B).

6.13.4.3 Penyiapan larutan asam folat standar

a) larutan induk:

- Timbang 50,0 mg asam folat di dalam labu ukur 500 ml;
- larutkan dengan 100 ml air suling; tambahkan 50 ml NaOH 0,1 N dan 100 ml;
- encerkan sampai tanda dengan air suling;
- simpanlah larutan induk ini di dalam lemari pendingin.

- b) beberapa menit sebelum diperlukan, encerkan 10 ml larutan induk sehingga larutan terakhir mengandung 0,2 µg/ml asam folat (larutan C).

6.13.4.4 Penyiapan larutan bacto *folic acid* casei medium

- a) siapkan larutan secukupnya sesuai yang diperlukan;
- b) siapkan larutan sesuai aturan buat yang tertera di label medium (larutan d).

6.13.4.5 Analisis

- a) siapkan satu seri larutan asam folat standar seperti di bawah ini:

satuan dalam mililiter

Larutan	Nomor tabung								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Larutan C	0	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5	3
Air suling	5	4,75	4,5	4,25	4	3,5	3	2,5	2
Medium D	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Siapkan tiga tabung untuk setiap nomor dan tutup dengan penutup *cap-o-test*.

- b) siapkan satu serf larutan contoh seperti di bawah ini:

satuan dalam miliiter

Larutan	Nomor tabung				
	9	10	11	12	13
Larutan B	0,25	0,5	0,75	1	1,5
Air suling	4,75	4,5	4,25	4	3,5
Medium D	5	5	5	5	5

Siapkan tiga tabung untuk setiap nomor dan tutup dengan penutup *cap -o-test*.

- c) sterilkan tabung tersebut di atas pada suhu 121 °C selama 10 menit;
- d) inokulasi dengan pipet steril satu tetes medium A ke dalam semua tabung reaksi tersebut di atas, kecuali tabung blanko;
- e) kocoklah tabung-tabung tersebut secara perlahan-lahan sampai medium tercampur merata;
- f) inkubasikan tabung-tabung tersebut pada suhu 37 °C selama 19 jam (bila perkembangan mikroorganismenya belum sempurna maka dapat memperpanjang waktu inkubasinya);
- g) kemudian dinginkan serentak semua tabung-tabung di dalam penangas air es;
- h) ukurlah dengan spektrofotometer, *transitance* larutan pada panjang gelombang 575 nm.

6.13.5 Perhitungan

- a) buat kurva standar asam folat pada kertas grafik;

$$b) \text{ konsentrasi asam folat pada contoh (} \mu\text{g/100g) = } \frac{C \times V_3 \times V_1 \times 100}{m \times V_2 \times 1000}$$

dengan:

C adalah rata-rata konsentrasi yang dibaca dari kurva standar;

V₁ adalah volume untuk melarutkan contoh, dinyatakan dalam ml;

V₂ adalah larutan B yang ditambahkan;

V₃ adalah volume pengenceran larutan B;

M adalah berat contoh yang ditimbang.

6.14 Cemarkan logam

Cara uji timbal (Pb), tembaga (Cu) dan raksa (Hg) sesuai dengan SNI 19-2896-1999 / Rev.1992, Cara uji cemarkan logam dalam makanan, butir 5 dan butir 6.

6.15 Cemarkan arsen

Cara uji cemarkan arsen sesuai dengan SNI 01-4866-1998, Cara uji cemarkan arsen dalam makanan.

6.16 Cemarkan mikroba

Cara uji cemarkan mikroba sesuai dengan SNI 19-2897-1992, Cara uji cemarkan mikroba.

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu butir 4.

8 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan Undang-undang RI No. 7 tahun 1996 tentang Pangan.

9 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

